Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus Holldack

Proliferationsanregung der Granulopoese in vitro durch Östrogen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sabine Schoen geb. Hamann
aus Berlin

1961

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535704_0015

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
Chefarzt: Professor Dr. med. Klaus Holldack

Proliferationsanregung der Granulopoese in vitro durch Östrogen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sabine Schoen geb. Hamann
aus Berlin

Dekan:	Professor Dr. med. W.	Maßhoff
Referent:	Professor Dr. med. K.	Holldack
Korreferent:	Professor Dr. med. H.	Herxheimer

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 19. Januar 1966

Gliederung

A Überblick über bisherige Versuche mit Follikelhormon am blutbildenden Gewebe bei Mensch und Tier in vivo und an Gewebekulturen.

B Die Wirkung von Östrogen auf menschliches Knochenmark in vitro.

1. Methode
2. Ergebnisse
   a) morphologisches Zellbild
   b) Reifungskurven der Granulopoese
   c) Mitoseindices der weißen Reihe und karyologische Kurven
   d) Erythropoese
   e) Reticulumzellen

C Diskussion

D Zusammenfassung

E Literaturverzeichnis

A Überblick über bisherige Versuche mit Follikelhormon am blutbildenden Gewebe bei Mensch und Tier in vivo und an Gewebekulturen.

Die physiologische Wirkung der östrogenen Steroide besteht im wesentlichen darin, nach der Menstruation das Endometrium wieder aufzubauen. Unter dem Einfluß des Follikelhormons erfolgt das numerische Wachstum der verbliebenen basalen Schleimhautschicht, in deren Drüsenepithelien und Stromazellen zahlreiche Mitosen auftreten.

Die Frage, ob das Follikelhormon über seine sexualspezifische Wirkung hinaus einen wachstumsanregenden Einfluß auch auf andere Gewebe besitzt, wurde in zahlreichen Versuchen am blutbildenden Gewebe bei Mensch und Tier in vivo und in Gewebekulturen geprüft.

ARNOLD, HAMPERL, HOLTZ, JUNKMANN und MARX [1] erzeugten beim Hund durch tägliche Verabreichung von 220-4400 γ Östradiol ein Krankheitsbild, das sie nach seinem eindrucksvollsten Symptom, der erhöhten Blutungsbereitschaft, als thrombopenische Purpura bezeichneten. Parallel mit der Abnahme der Thrombocyten sanken die Erythrocyten, Reticulocyten und der Hämoglobinwert bis zur schweren Anämie ab.

Im weißen Blutbild dagegen trat zunächst eine Leukocytose auf, die vorwiegend auf einer Vermehrung der neutrophilen Segmentkernigen beruhte. Es wurde daher angenommen, daß das Follikelhormon eine anregende Wirkung auf die Leukopoese im Knochenmark besitzt und die Ausreifung der weißen Zellen beschleunigt. Nach kurzer Zeit ging die Leukocytose durch Abnahme der Granulocyten in eine Leukopenie über. Das Sternalmark der Versuchstiere bot den Blutbildveränderungen entsprechende Befunde: Schädigung des roten Marks, verminderte und degenerativ veränderte Megakaryocyten, deutliche myeloische Reaktion - Zunahme der Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten und neutrophilen Stabkernigen - zu Beginn der Versuchszeit und Hemmung der Leukopoese - Abnahme der Myelocyten und Stabkernigen - im weiteren Verlauf.

Grundsätzlich ähnliche Ergebnisse erhielten auch andere Autoren in ihren Versuchen mit Östrogenen am Hund. (v. BALÓ und PURJESZ [2], BAREUTHER und SCHABBEL [3], ARNOLD [4], DUBRAUSZKY und MARTZY [5]).

DUKES und GOLDWASSER [6] beobachteten bei männlichen Ratten eine signifikante Herabsetzung der Erythropoese durch Östrogene. Der Wirkungseintritt für Östradiol lag bei 1,9 γ pro Ratte mit einem Körpergewicht von 160 bis 200 g. Die Beobachtungen FEUCHTINGER'S [7,8] dagegen sprechen für einen stimulierenden Einfluß des Follikelhormons auf die Erythropoese. Er fand bei der Ratte zur Zeit des Östrus stets eine Erhöhung der Erythrocytenzahl und des Hämoglobinwertes und beobachtete regelmäßig nach der Kastration weiblicher Kaninchen und Ratten das Auftreten einer Anämie, die er auf den Wegfall des Follikelhormons zurückführte. Auch beim Menschen bestehen analoge Zusammenhänge zwischen Blutbildung und Ovarialtätigkeit: so kommt es im Prämenstruum zu einem Anstieg der Thrombocyten, Erythrocyten und des Hämoglobins, während im Klimakterium als Folge der verminderten Follikelhormonproduktion häufig ein Absinken der Erythrocyten und des Hämoglobinwertes beobachtet wird (FEUCHTINGER [8]).

Die in Untersuchungen an Mensch und Tier immer wieder festgestellte Wirkung des Follikelhormons, abhängig von der Höhe der verabreichten Dosis eine Vermehrung oder Verminderung der Blutzellen hervorzurufen, bezeichnet FEUCHTINGER [7] als "Gesetz der Sexualhormonwirkung", das in Abwandlung der SCHULTZ-ARNDT'schen Regel lautet: Kleine Mengen von Follikelhormon regen die Knochenmarktätigkeit an, große Dosen hemmen sie. Bemerkenswert ist, daß zur Stimulierung der Erythro- und Thrombopoese eine wesentlich geringere Menge an Follikelhormon notwendig ist als zur Anregung der Granulopoese, und daß die beiden ersten dementsprechend bereits bei einer Dosishöhe gehemmt werden, die für das leukopoetische System noch einen starken Reiz bedeutet.

Die Verabreichung von Östradiol an gesunde Frauen in der Menopause ruft dieselben charakteristischen Blutbildveränderungen hervor wie sie bei den Versuchstieren gefunden wurden. (FEUCHTINGER [7], BOKELMANN [9], DIESTERBECK [10]).

Neben ihrer indirekten hormonalen Wirkung sollen die östrogenen Steroide nach GERHARTZ [11] auch eine direkte cytostatische Wirkung besitzen. Diese Annahme stützt sich auf Versuche v. MÖLLENDORFF's [12, 13], der in Fibroblastenkulturen unter der Einwirkung von Östrogenen in den Konzentrationen von 0,5 mg% bis 10 mg% das gehäufte Auftreten pathologischer Mitoseformen mit Chromosomenabsprengungen im Stadium der Äquatorialplatte beobachtete. GERHARTZ [11] bezieht sich ferner auf die Arbeiten von DRUCKREY [14], der am befruchteten Seeigelei cytostatische Eigenschaften des Diäthylstilböstrols nachwies. Die mittlere wirksame Dosis betrug 0,05mg%. DRUCKREY [15, 16] führt die gute Wirksamkeit des Diäthylstilböstrolphosphats beim Prostata-Carcinom auf eine lokale cytostatische Wirkung des Diäthylstilböstrols zurück, das aus der Phosphatverbindung durch die im Prostatacarcinomgewebe reichlich vorhandenen Phosphatasen freigesetzt wird. Der Phosphorsäureester des Diäthylstilböstrols soll nach DRUCKREY [15, 16] keine nennenswerte östrogene Wirkung besitzen, so daß eine Hemmung des Krebswachstums über hormonale Faktoren ausgeschlossen wird. Diese Theorie über die Wirkungsweise des Diäthylstilböstrolphosphats wird von HOHLWEG und GROOT-WASSINK [17] auf Grund ihrer an Ratten gewonnenen Versuchsergebnisse abgelehnt. Sie stellten durch Bestimmung des Östrusgrenzwertes fest, daß der Phosphorsäureester dieselbe östrogene Wirkung besitzt wie das freie Hormon. Daher nehmen sie an, daß das Diäthylstilböstrolphosphat gleich anderen östrogenen Stoffen unter Vermittlung eines diencephalen Sexualzentrums eine Herabsetzung der Gonadotropinproduktion im Hypophysenvorderlappen und somit eine Verminderung der Androgenbildung in den Hoden bewirkt. Dadurch wird die Wachstumsintensität des Prostatacarcinoms, die von der Höhe des Androgenblutspiegels abhängig ist, herabgesetzt.

Mitoseinhibition durch Östrogenkonzentrationen zwischen 0,25 mg% und 1 mg% wurde von AGRELL [18] an sich entwickelnden Eiern und von BULLOUGH [18] in der Epidermiskultur beobachtet.

LETTRÉ [19, 20] sah Mitosehemmung und Aufhebung des Wachstums durch Östrogene in Fibroblastenkulturen. Die untere Wirkungsgrenze lag bei 4 mg%.

Die für die Mitosestörung erforderliche Menge an Östradiol betrug demnach ungefähr das Dreißigtausendfache des physiologischen Wertes. LETTRÉ [19] hält es für möglich, daß die normalerweise wachstumsanregende Wirkung des Follikelhormons mit steigender Dosis in ihr Gegenteil umschlägt, entsprechend der SCHULTZ-ARNDT'schen Regel: kleine Dosen reizen und fördern, große Dosen hemmen und heben auf. Diese Annahme entspricht dem von FEUCHTINGER [7] aufgestellten 'Gesetz der Sexualhormonwirkung'. LETTRÉ [20] gibt aber zu bedenken, daß die Wirkung der Östrogene auf Fibroblasten nicht ohne weiteres mit ihrer physiologischen sexualspezifischen Funktion verglichen werden darf.

KUCHLER, ARNOLD und GRAUER [21] fanden bei Zusatz von 0,1 mg% radioaktivem Östradiol bzw. Östron zu Mäusefibroblastenkulturen, daß die Steroidmoleküle innerhalb weniger Minuten aus dem Nährmedium an die Zelloberfläche adsorbiert werden. Dadurch soll die Aufnahme lebenswichtiger Stoffe in die Zelle weitgehend verhindert und das Zellwachstum gehemmt werden.

Die Untersuchungsergebnisse in der Gewebezüchtung stehen in deutlichem Gegensatz zu den Beobachtungen über die Wirkung des Follikelhormons auf die Blutbildung von Mensch und Tier, was sich aus der Diskrepanz der jeweils angewandten Dosen erklären läßt.

B Die Wirkung von Östrogen auf menschliches Knochenmark in vitro.

In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob Östrogen eine direkte stimulierende Wirkung auf die Knochenmarkzellen besitzt, und ob die Vermehrung der Mitosen, wie sie von LETTRÉ [19,20], SCHLAG und BOLL [22] in Gewebekulturen gefunden wurde, auf einer echten Anregung der Mitoseaktivität beruht (BOLL [23]), oder ob sie auf eine Hemmung im Teilungsvorgang zurückzuführen ist. (LETTRÉ [19]).

Es wurden Knochenmarkkulturen mit verschiedenen Konzentrationen von Östrogen im Nährmedium und ohne Zusatz als Kontrolle angelegt. Nach Differentialzählungen wurden Reifungskurven und karyologische Kurven der Granulopoese angefertigt und die Mitoseindices der weißen Reihe in einer Tabelle zusammengestellt.

1. Methode

Nach der von BOLL und FUCHS [24] in Anlehnung an die CARREL'sche Technik entwickelten Methode der Gewebezüchtung auf dem hängenden Koagulum wurden Kulturen von menschlichem Knochenmark angelegt. Es wurde Sternalmark von vier männlichen Patienten und einer Frau verwendet, bei welchen keine Primärerkrankung des hämopoetischen Systems vorlag. Die Untersuchungen wurden also an weitgehend normalem Knochenmark durchgeführt.

Das Nährmedium enthielt 50 % Eigenplasma des betreffenden Patienten, 30 % 'Corhormon' [+] und 20 % Hank'sche Lösung. Das auf dieses Koagulum gesetzte Markbröckchen wurde mit einem Tropfchen Eigenserum bedeckt, in welches ein Teil der Knochenmarkzellen nach längerer Bebrütungszeit auswanderte.

[+] Dieses Präparat wird vom Chemiewerk Homburg hergestellt.

Folgende Kulturen wurden angelegt:

a) Kontrollkulturen ohne Zusatz

b) Versuchskulturen mit einem Zusatz von Oestronsulfat als Natriumsalz ++) in den Konzentrationen von

0,5 mg% in fünf Fällen

5 mg% in zwei Fällen

50 mg% in einem Fall

Dieses Östrogen hat den Vorteil, wasserlöslich zu sein, wodurch Nebenwirkungen durch den Lösungsvermittler auf die Knochenmarkkultur entfallen. Nach annähernd 24, 48 und 72 Stunden Bebrütungsdauer wurden von den Kulturen Ausstriche angefertigt und nach PAPPENHEIM gefärbt. Ebenso wurden unmittelbar nach der Sternalpunktion Ausstrichpräparate hergestellt.

Da die in den Serumtropfen ausgewanderten Zellen durchschnittlich reifer sind als jene im Reticulum des Knochenmarks, wurde bei der Differentialzählung das Verhältnis dieser beiden Anteile zueinander berücksichtigt, um den Reifegrad der einzelnen Kulturen möglichst genau zu erfassen. Zur exakten Differenzierung der Zelltypen wurden Gebiete mit aufgelockertem Zellgehalt bevorzugt. In den Ausstrichpräparaten der Kulturen wurden jeweils 1000 bis 2000 Zellen differenziert.

Durch Differentialzählung von 1000 weißen Zellen je Kultur wurde die relative Zellzusammensetzung innerhalb der weißen Reihe und ihre fortlaufende Änderung während der Kulturzeit von 3 Tagen erfaßt. In Reifungskurven wurden die Zählergebnisse graphisch dargestellt.

Der Mitoseindex der weißen Reihe, der die Zahl der Mitosen auf 1000 teilungsfähige Zellen angibt, wurde durch Zählung von 1000 bis 6000 teilungsfähigen Vorstufen in einer Kultur ermittelt. Es gehören hierzu die Myeloblasten, Promyelocyten, Myelocyten und Jugendlichen.

++) Die Firma Schering stellte uns das Präparat freundlicherweise zur Verfügung.

In einer karyologischen Kurve wurde die prozentuale Verteilung der Mitosephasen aufgezeichnet.

Durch Differentialzählung der Erythroblasten wurde die Reifung innerhalb der roten Reihe erfaßt. Die in jeder Kultur ausdifferenzierte Zahl an Erythroblasten entsprach ihrem jeweiligen Anteil auf 1000 weiße Zellen.

Die Summe aller gezählten Zellen beträgt:

in der weißen Reihe:	42 000 Zellen
in der roten Reihe:	10 000 Zellen
bei den lymphoiden Reticulum-zellen, Lymphocyten, Plasma-zellen und Megakaryocyten:	10 300 Zellen

Die Differenzierung erfolgte:

bei der Erythropoese in:

Proerythroblasten,
basophile Erythroblasten,
polychromatische Erythroblasten,
oxyphile Erythroblasten und
reife Erythroblasten;

bei der Granulopoese in:

Myeloblasten,
Promyelocyten,
neutrophile, eosinophile und
basophile Myelocyten,
neutrophile Metamyelocyten,
neutrophile stabkernige Granulocyten,
neutrophile, eosinophile und
basophile segmentkernige Granulocyten.

Wegen des verhältnismäßig geringen Anteils der eosinophilen Zellen in der weißen Reihe wurde auf eine Differenzierung in Metamyelocyten und Stabkernige verzichtet. Die eosinophilen Jugendlichen wurden zu den Myelocyten,

die Stabkernigen zu den Segmentkernigen gerechnet.

Die basophilen Zellen blieben wegen ihres überaus seltenen Vorkommens in den Zählergebnissen unberücksichtigt.

Erythropoese

Der Proerythroblast (Kerndurchmesser um 13 /u nach WEICKER) ist die größte Zelle dieser Reihe. Der runde Kern besitzt eine feinkörnige Chromatinstruktur und läßt in der Regel 2 bis 3 Nukleolen erkennen. Das dunkelblaue Plasma ist von leicht inhomogener Beschaffenheit.

Der basophile Erythroblast (Kerndurchmesser 10,3 /u) besitzt reichlich intensiv blau gefärbtes Cytoplasma. Die grobschollige Kernstruktur läßt bereits in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße eine radiäre Anordnung des Chromatins erkennen. Nukleolen fehlen meistens.

Die Farbe des polychromatischen Erythroblasten (Kerndurchmesser 8,2 /u bis 6,5 /u) liegt wechselnd zwischen Graublau und Graurosa, je nach der Menge des eingelagerten Hämoglobins im Cytoplasma. Der scharf konturierte Kern besitzt eine charakteristische Radiärstruktur des Chromatins.

Das Plasma des oxyphilen Erythroblasten (Kerndurchmesser 5,2 /u) besitzt auf Grund seines reichlichen Hämoglobingehaltes die gleiche Farbe wie der Erythrocyt. Das Chromatin des Kerns läßt noch eine deutliche radiäre Anordnung erkennen.

Als reife Erythroblasten bezeichnen wir die erythropoetischen Vorstufen mit einem pyknotischen Kern.

Granulopoese

Der Myeloblast (Durchmesser um 15 /u) ist die Stammzelle der weißen Reihe. Sein runder Kern besitzt eine feine netzförmige Chromatinstruktur und 1 bis 3 deutlich erkennbare Nukleolen. Dieser füllt die Zelle weitgehend aus, so daß nur ein schmaler Plasmasaum sichtbar ist. Das zartblaue Plasma

enthält noch keine azurophilen Granula.

Der Promyelocyt (Durchmesser 16 /u bis 27 /u) ist die größte Zelle dieser Reihe. Die Form des Kerns ist rund, oval oder bohnenförmig, seine Struktur dichter als beim Myeloblastenkern. Häufig weist er noch deutlich erkennbare Nukleolen auf. Die Kern-Plasma-Relation ist gegenüber dem Myeloblasten zugunsten des Plasmas verschoben. Dieses ist schwächer basophil und von einer plumpen dunkelroten Granulation erfüllt. Oft findet sich paranukleär eine kleine granulafreie Aufhellungszone im Cytoplasma.

Der Myelocyt (Durchmesser 14 /u bis 18 /u) erlaubt durch seine spezifische Granulation eine Differenzierung in neutrophile, eosinophile und basophile Zellen. Der rundliche oder ovale Kern hat eine dichte, grobbalkige Chromatinstruktur und läßt keine Nukleolen mehr erkennen. Im oxyphilen Plasma finden sich reichlich neutrophile, eosinophile und basophile Granula. Es wurde bei den Zählungen nicht zwischen reiferen und unreiferen Myelocyten unterschieden.

Der Metamyelocyt, auch jugendlicher Granulocyt genannt, ist durch einen eingebuchteten Kern mit dichter Chromatinstruktur und durch reifes oxyphiles Plasma mit den spezifischen Granulationen gekennzeichnet.

Der stabkernige Granulocyt besitzt einen schlanken, gebogenen Kern, der oft schon einzelne Segmentanlagen erkennen läßt.

Bei dem segmentkernigen Granulocyten (Durchmesser 10 /u bis 15 /u) sind die Segmente durch fadenförmige Brücken miteinander verbunden. Der neutrophile Granulocyt besitzt meist 3 bis 4 Segmente, der eosinophile Granulocyt in der Regel 2 Teilstücke.

Der Ablauf der Mitose wurde nach BOLL [25] in sechs Phasen unterteilt.

In der Prophase hat sich die Kernmembran aufgelöst, und die Nukleolen sind verschwunden. Die Chromosomen werden als dünne Fäden sichtbar. Sie bilden ein festes Spirem.

In der frühen Metaphase liegen die Chromosomen ungeordnet im Teilungsraum (lockeres Spirem).

Die späte Metaphase umfaßt das Stadium der Äquatorialplatte. In der Aufsicht ist die Monasterbildung der nun verdoppelten Chromosomen deutlich zu erkennen.

In der Anaphase sind die Chromosomen in zwei Gruppen angeordnet. Sie bilden einen Diaster.

In der Telophase zeichnet sich die Durchschnürung des Zelleibes ab. Die Chromosomen der Tochterkerne bilden ein lockeres Dispirem.

In der Rekonstruktionsphase sind die beiden Tochterzellen häufig noch durch einen feinen Plasmafaden miteinander verbunden. Die Chromosomen sind in einem festen Dispirem angeordnet, Kernmembran und Nukleolen haben sich noch nicht ausgebildet.

Signifikanzberechnung

Um zu prüfen, wie weit die Zellverteilungen auf die einzelnen Reifungsstadien bei dem Östrogenzusatz von 0,5 mg% und ohne Zusatz voneinander abweichen, wurde das χ^2 - Verfahren von HELMERT-PEARSON [26] für jede Auszählung durchgeführt. Es wurden dabei jeweils die Verteilungszahlen von 1000 gezählten weißen Zellen mit und ohne Östrogen zugrundegelegt. In der Mehrzahl der Gegenüberstellungen betrug die Wahrscheinlichkeit (P) dafür, daß die Unterschiede zwischen Östrogen- und Kontrollkulturen nur durch den Zufall bedingt sind, weniger als 1 ‰.

Bei solchen Zählberechnungen ist ein Ergebnis von $\chi^2 = 18$, entsprechend P = 1 %, für eine Signifikanz ausreichend.

2. Ergebnisse

a) Das morphologische Zellbild der Kulturen mit dem Östrogen-Zusatz von

0,5 mg% im Nährmedium unterscheidet sich nicht von dem der Kontrollkulturen.

Bei der Konzentration von 5 mg% werden in der weißen Reihe besonders nach 72 bzw. 75 Stunden Kulturzeit Kernanomalien, polyploide Zellen und Riesenformen vermehrt gefunden.

Die Konzentration von 50 mg% Östrogen führt zu einer Schädigung der Zellen, die besonders in der weißen Reihe deutlich erkennbar ist, während die Erythroblasten ein weitgehend normales Aussehen aufweisen. Das Cytoplasma der Promyelocyten und neutrophilen Myelocyten ist von einer auffallend weißen Farbe und besitzt eine grobe, dunkle Granulation. Eosinophile Zellen werden nicht gefunden. Bei vielen Granuloblasten zeigt der Kern eine degenerativ veränderte, aufgelockerte Struktur. Um die 48. Kulturstunde fällt bei vielen Zellen eine starke Vakuolisierung des Cytoplasmas auf.

b) Getrennt für jeden Versuch und für jede Östrogen-Konzentration wurden Reifungskurven der Granulopoese aufgestellt.

Der prozentuale Anteil der einzelnen Zellformen ist als Funktion der Zeit aufgetragen.

Bei der zeichnerischen Darstellung wurden folgende Abkürzungen verwendet:

MB = Myeloblasten
P = Promyelocyten
NM = neutrophile Myelocyten
EM = eosinophile Myelocyten
J = neutrophile jugendliche Granulocyten
ST = neutrophile stabkernige Granulocyten
NS = neutrophile segmentkernige Granulocyten
ES = eosinophile segmentkernige Granulocyten

Ferner gelten folgende Kennzeichen:

---------- Kontrollkulturen

———————— Östrogenkulturen

Die erste Versuchsreihe wurde mit Sternalmark eines 62-jährigen Mannes mit einem Bronchial-Carcinom durchgeführt.

Der Originalausstrich zeigte neben einer unauffälligen Granulopoese eine angeregte Erythropoese.

Zur Zeit der Sternalpunktion bestand ein normales Blutbild.

Um die günstigste Östrogenkonzentration für einen stimulierenden Einfluß auf die Granulopoese zu ermitteln, wurden Kulturen mit den Zusätzen von 50 mg%, 5 mg% und 0,5 mg% Östronsulfat im Nährmedium angelegt.

In der Kontrollkultur (Abb. 1) zeigt sich nach 26 Stunden gegenüber dem Originalausstrich der übliche Anstieg der Promyelocyten und Myelocyten, während die reiferen Zellen - Jugendliche, Stab- und Segmentkernige - an Zahl abgenommen haben.

Nach 48 Stunden haben die reiferen Zellen wieder zugenommen, und um die 75. Stunde ist ihr prozentualer Anteil weiter angestiegen.

Bei der Östrogenkonzentration von 50 mg% (Abb. 1) geht die Ausreifung der Granuloblasten bis zur 48. Kulturstunde im wesentlichen nicht über das Stadium der Myelocyten hinaus.

Erst um die 75. Stunde werden mit der Abnahme der Promyelocyten und dem vermehrten Auftreten von Jugendlichen, Stabkernigen und neutrophilen Segmentkernigen Ansätze einer beginnenden Ausreifung erkennbar.

1. Versuchsreihe

Östrogenkonzentration 50 mg %

Abbildung 1

Die Reifungskurven der Kulturen mit dem Östrogenzusatz von 5 mg% (Abb. 2) entsprechen bis zu 48 Stunden wieder mehr den Kontrollkulturen. Der prozentuale Anteil der reiferen Zellen - der Jugendlichen, Stabkernigen und neutrophilen Segmentkernigen - ist nach 26 und 48 Stunden Kulturzeit allerdings größer als in den Kontrollversuchen.

Um die 75. Stunde findet sich ein zweiter Anstieg der Promyelocyten bei Abnahme der Myelocyten und Jugendlichen. Die Zahl der Stab- und Segmentkernigen hat sich nicht wesentlich geändert.

Die Konzentration von 0,5 mg% Östrogen (Abb. 3) zeigt den deutlichsten Effekt hinsichtlich einer Beschleunigung der Zellausreifung. Nach 48 Stunden Kulturzeit beträgt die Zahl der neutrophilen Segmentkernigen das Doppelte des Kontrollwertes. Eine entsprechende Verminderung findet sich insbesondere bei den Promyelocyten und Myelocyten. Die Änderung der Zellverteilung durch Östrogen ist hoch signifikant. Die Berechnung ergibt $\chi^2 = 54$, $P < 1$ ‰.

Um die 75. Stunde fällt die Verminderung der neutrophilen Segmentkernigen und die Zunahme der stabkernigen Granulocyten auf. In den übrigen Zellgruppen sind die Werte gegenüber der 48-Stundenkultur kaum verändert.

1. Versuchsreihe

Östrogenkonzentration 5mg %

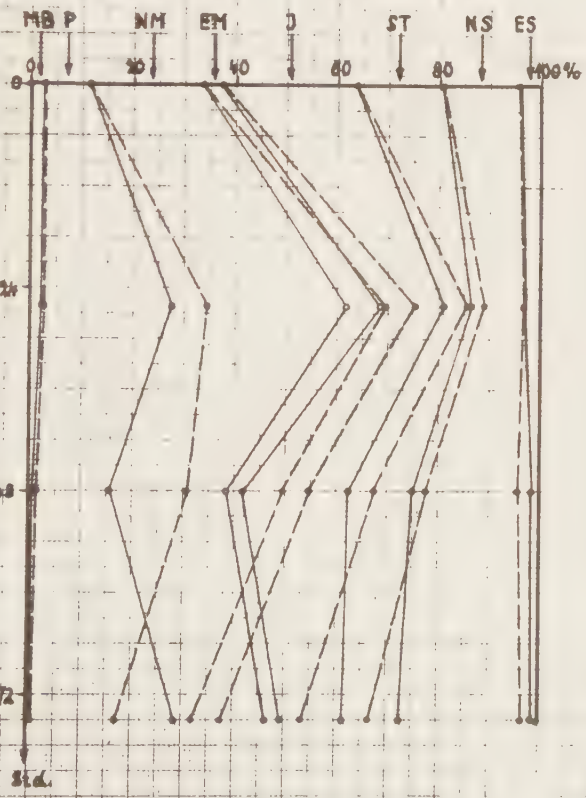

Abbildung 2

1. Versuchsreihe

Östrogenkonzentration 0,5mg%

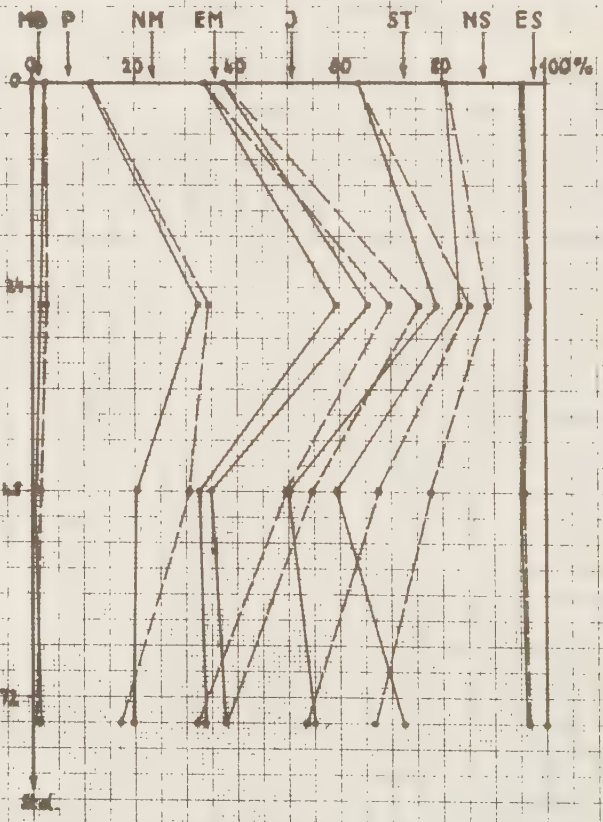

Abbildung 3

Für die zweite Versuchsreihe wurde Knochenmark eines 55-jährigen Manne mit einem Bronchial-Carcinom verwendet.

Im Sternalmarkausstrich lagen eine unauffällige Granulo- und Erythropoese vor.

Im Blutbild bestanden zur Zeit der Punktion eine mäßige Leukocytose und eine normochrome Anämie.

Da im vorangehenden Versuch festgestellt wurde, daß Östronsulfat in der Konzentration von 50 mg% eine Zellschädigung mit Hemmung der Ausreifung bewirkt, wurden nur Kulturen mit den Zusätzen von 5 mg% und 0,5 mg% angelegt.

Beim Vergleich der Kontrollkulturen mit den Versuchskulturen beider Östrogenkonzentrationen fällt eine weitgehende Übereinstimmung im Verlauf der Reifungskurven auf. (Abb. 4 und 5)

In der 5 mg%-Kultur (Abb. 4) sind die neutrophilen Segmentkernigen lediglich nach 24 Stunden auf das Doppelte des Kontrollwertes vermehrt. Im weiteren Verlauf bestehen keine wesentlichen Unterschiede zu den Kontrollversuchen.

Dagegen ist es in den Kulturen mit dem Östrogenzusatz von 0,5 mg% (Abb. 5) zu einer deutlich beschleunigten Ausreifung gekommen. Der Schwerpunkt der Zellverschiebung durch Östrogen liegt stets in einer starken Vermehrung der neutrophilen Segmentkernigen bei entsprechender Verminderung der unreifen Zellen, die nach 48 Stunden Kulturzeit insbesondere Promyelocyten und neutrophile Myelocyten, nach 72 Stunden neutrophile Myelocyten und Jugendliche betrifft.

Die Berechnung der Signifikanz ergibt für jede Auszählung $\chi^2 > 26$, $P < 1\ ‰$.

2. Versuchsreihe

Östrogenkonzentration 5 mg %

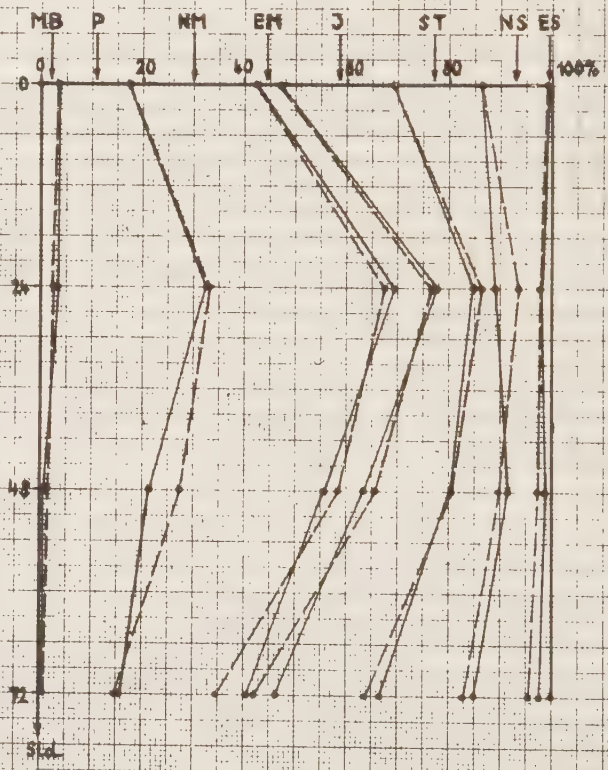

Abbildung 4

2. Versuchsreihe

Östrogenkonzentration 0,5 mg%

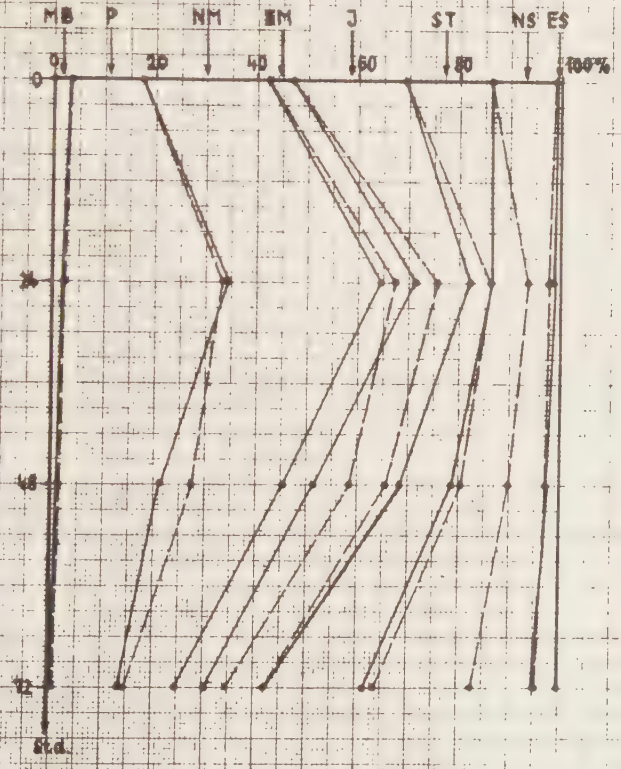

Abbildung 5

Die Ergebnisse dieser beiden Versuchsreihen lassen erkennen, daß ein Zusatz von 0,5 mg% Östronsulfat zum Nährmedium die optimale Konzentration für die Stimulierung der Zellentwicklung darstellt.

Die folgenden drei Versuche wurden daher nur noch mit diesem Östrogenzusatz durchgeführt.

Im dritten Versuch wurde Sternalmark eines 66-jährigen Mannes verwendet, bei welchem eine Pneumonie und ein paralytischer Ileus bestanden.

Der Originalausstrich wies neben einer unauffälligen Granulopoese eine angeregte Erythropoese auf.

Zur Zeit der Sternalpunktion lagen im Blutbild eine mäßige Leukocytose und eine erhebliche Anämie vor.

Die Reifungskurven der Kontroll- und Versuchskulturen weisen eine große Ähnlichkeit mit jenen des zweiten Versuches auf (Abb. 6).

Schon nach 24-stündiger Kulturzeit sind bei Östrogenzusatz die neutrophilen Segmentkernigen gegenüber dem Kontrollwert signifikant vermehrt, die Promyelocyten deutlich vermindert.

Um die 48. und 74. Kulturstunde findet sich bei einem geringen Anteil an Jugendlichen eine starke Reduktion der Promyelocyten und neutrophilen Myelocyten zugunsten der neutrophilen Segmentkernigen, deren Anteil in der 74. Stunde das Zweieinhalbfache des Kontrollwertes beträgt.

Für jede Auszählung ergibt sich ein Signifikanzwert von $\chi^2 \geq 34$, $P < 1\,‰$.

3. Versuchsreihe

Östrogenkonzentration 0,5mg%

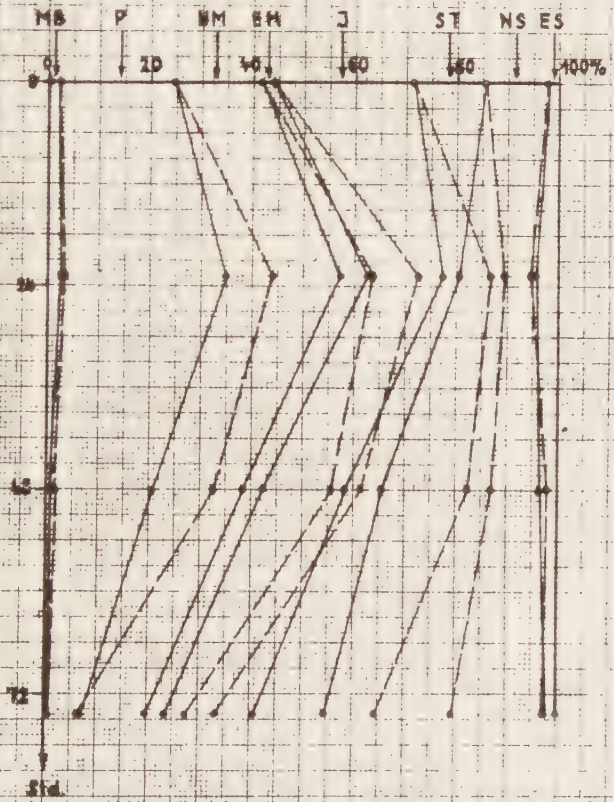

Abbildung 6

Für den vierten Versuch wurde Sternalmark eines 71-jährigen Mannes genommen, bei welchem ein histologisch nicht eindeutig zu differenzierendes Bronchial-Carcinom vorlag. Ein seit längerer Zeit bestehender M. Biermer war durch die Therapie mit Vitamin B_{12} im Sternalmarkausstrich nicht mehr zu erkennen, Granulo- und Erythropoese waren unauffällig.

Im Blutbild bestanden zur Zeit der Punktion eine erhebliche Leukocytose mit Linksverschiebung und eine mäßige normochrome Anämie.

Von den Kulturen wurden Ausstrichpräparate nur nach 24 und 72 Stunden angefertigt.

Um die 24. Stunde findet sich in der Östrogenkultur (Abb. 7) eine leichte Vermehrung der neutrophilen Segmentkernigen gegenüber dem Kontrollwert. Die Unterschiede in der Zellverteilung zwischen Kontroll- und Versuchskultur sind jedoch nicht signifikant.

Um die 72. Kulturstunde sind die Promyelocyten in der Kontroll- und Versuchskultur nahezu völlig aus dem Zellbild verschwunden. Unter der Einwirkung von Östrogen ist es zur signifikanten Vermehrung der Stabkernigen und neutrophilen Segmentkernigen gegenüber den Kontrollwerten gekommen. Entsprechend ist der Anteil der Myelocyten erheblich geringer als in der Kontrollkultur.

Die Signifikanzberechnung ergibt $\chi^2 = 44$, $P < 1$ ‰.

4. Versuchsreihe

Östrogenkonzentration 0,5mg%

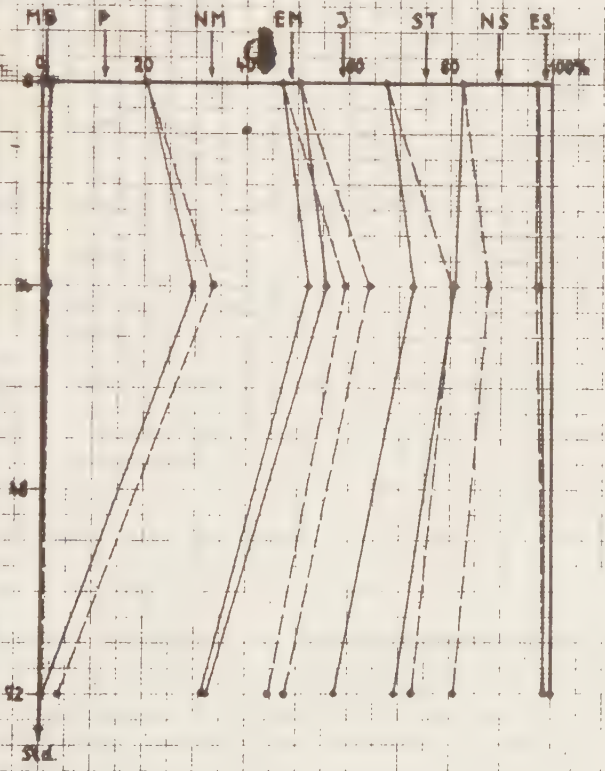

Abbildung 7

Im fünften Versuch wurde Knochenmark einer 80-jährigen Frau mit einer Pneumonie verwendet.

Im Sternalmarkausstrich fiel die große Anzahl an Myeloblasten auf, die zum Teil ein atypisches Aussehen aufwiesen. Der Kern dieser atypischen Zellen hatte eine reifere Struktur als der normale Myeloblastenkern, ließ aber deutliche Nukleolen erkennen. Hellblaues, granulafreies Plasma war reichlicher als bei normalen Myeloblasten vertreten. In den übrigen Reifestadien wich das Aussehen der Zellen nicht von der Norm ab. In den Kulturausstrichen wurden solche atypische Zellen nicht gefunden.

Die Erythropoese war unauffällig.

Im Blutbild bestand zur Zeit der Punktion eine Leukocytose mit Linksverschiebung.

Um die 24. Kulturstunde haben die Myeloblasten in der Kontroll- und Östrogenkultur auf 15 % ihres Ausgangswertes und somit auf den üblichen Anteil abgenommen (Abb. 8). Der gleichzeitige Anstieg der Promyelocyten erreicht in der Kontrollkultur höhere Werte als in der Kultur mit Östrogenzusatz, die einen größeren Anteil an Stab- und Segmentkernigen aufweist.

Die Änderung der Zellverteilung durch Östrogen ist signifikant: $\chi^2 = 22$, $P < 1\ \%$.

Es fällt auf, daß bei unveränderter Gesamtzahl der Myelocyten eine deutliche Vermehrung der Eosinophilen gegenüber dem Originalausstrich erfolgt ist, in der Kontrollkultur stärker als bei Östrogenzusatz.

Um die 48. Stunde ist im wesentlichen eine Ausreifung der Promyelocyten zu Myelocyten erfolgt, wobei in der Östrogenkultur eine weitere Zunahme der Eosinophilen stattgefunden hat, deren Anzahl nun dem Kontrollwert entspricht. Der Anteil an reiferen Zellen - an Jugendlichen, Stabkernigen und neutrophilen Segmentkernigen - hat sich verringert.

5. Versuchsreihe

Östrogenkonzentration 0,5mg%

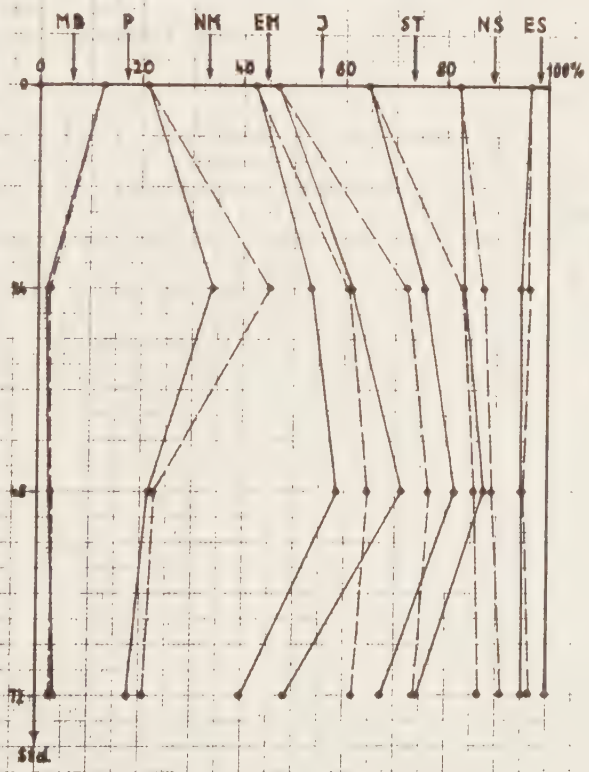

Abbildung 8

Zu diesem Zeitpunkt besteht kein signifikanter Unterschied in der Zellzusammensetzung der Kontroll- und Östrogenkultur.

Während jedoch um die 72. Kulturstunde die Kontrollwerte unverändert sind, ist es unter der Einwirkung von Östrogen zu einer stärkeren Ausreifung der Zellen gekommen mit signifikanter Zunahme der Jugendlichen und neutrophilen Segmentkernigen zu ungunsten der Promyelocyten und Myelocyten.

Bei der Berechnung der Signifikanz beträgt der Wert für $\chi^2 = 90$, $P < 1$ ‰.

Signifikanzberechnung nach dem χ^2 - Verfahren von HELMERT PEARSON [26].

a = Kulturen mit 0,5 mg% Östrogen

b = Kontrollkulturen

Der Wert von $\chi^2 = 18$ entspricht P = 1%

Der Wert von $\chi^2 = 24$ entspricht P = 1‰.

Nähere Erklärungen finden sich im Text.

1. Versuchsreihe

Kulturzeit: 26 Stunden

	a	b	$m = \frac{1}{2}(a+b)$	$\Delta = \lvert a-m \rvert$	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	15	27	21	6	36	1,71
Promyelocyten	307	317	312	5	25	0,08
neutrophile Myelocyten	269	354	311,5	42,5	1806,25	5,80
eosinophile Myelocyten	64	54	59	5	25	0,42
Jugendliche	134	102	118	16	256	2,17
Stabkernige	42	36	39	3	9	0,23
neutrophile Segmentkernige	134	78	106	28	784	7,34
eosinophile Segmentkernige	35	32	33,5	1,5	2,25	0,07

$$\chi^2 = \sum \frac{\Delta^2}{m}$$

$$= 17,82$$

$$P \approx 1\%$$

Kulturzeit:48 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	3	12	7,5	4,5	20,25	2,70
Promyelocyten	201	295	248	47	2209	8,91
neutrophile Myelocyten	123	189	156	33	1089	7,00
eosinophile Myelocyten	23	50	36,5	13,5	182,25	5,00
Jugendliche	149	128	138,5	10,5	110,25	0,80
Stabkernige	94	103	98,5	4,5	20,25	0,21
neutrophile Segmentkernige	358	181	269,5	88,5	7832,25	29,06
eosinophile Segmentkernige	49	42	45,5	3,5	12,25	0,23

$\chi^2 = 53,91$

$P < 1‰$

Kulturzeit: 75 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	11	5	8	3	9	1,13
Promyelocyten	186	165	175,5	10,5	110,25	0,63
neutrophile Myelocyten	142	150	146	4	16	0,11
eosinophile Myelocyten	39	58	48,5	9,5	90,25	1,86
Jugendliche	172	155	163,5	8,5	72,25	0,44
Stabkernige	174	133	153,5	20,5	420,25	2,74
neutrophile Segmentkernige	245	301	273	28	784	2,87
eosinophile Segmentkernige	31	33	32	1	1	0,03

$\chi^2 = 9,81$

$P > 1\%$

2. Versuchsreihe

Kulturzeit: 24 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	19	22	20,5	1,5	2,25	0,11
Promyelocyten	323	309	316	7	49	0,15
neutrophile Myelocyten	304	341	322,5	18,5	342,25	1,05
eosinophile Myelocyten	68	86	77	9	81	1,05
Jugendliche	107	105	106	1	1	0,00
Stabkernige	43	75	59	16	256	4,33
neutrophile Segmentkernige	121	41	81	40	1600	19,75
eosinophile Segmentkernige	15	21	18	3	9	0,50

$\chi^2 = 26,94$

$P < 1‰$

Kulturzeit: 48 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	8	13	10,5	2,5	6,25	0,59
Promyelocyten	203	260	231,5	28,5	812,25	3,50
neutrophile Myelocyten	242	310	276	34	1156	4,19
eosinophile Myelocyten	61	73	67	6	36	0,53
Jugendliche	170	150	160	10	100	0,62
Stabkernige	104	93	98,5	5,5	30,25	0,30
neutrophile Segmentkernige	183	72	127,5	55,5	3080,25	24,15
eosinophile Segmentkernige	29	29	29	0	0	0,00

$\chi^2 = 33,88$

$P < 1‰$

Kulturzeit: 72 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	3	5	4	1	1	0,25
Promyelocyten	132	143	137,5	5,5	30,25	0,22
neutrophile Myelocyten	114	200	157	43	1849	11,72
eosinophile Myelocyten	56	72	64	8	64	1,00
Jugendliche	115	218	166,5	51,5	2652,25	15,92
Stabkernige	196	191	193,5	2,5	6,25	0,03
neutrophile Segmentkernige	333	123	228	105	11025	48,35
eosinophile Segmentkernige	51	48	49,5	1,5	2,25	0,04

$\chi^2 = 77,53$

$P < 1‰$

3. Versuchsreihe

Kulturzeit: 23 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	27	31	29	2	4	0,14
Promyelocyten	323	409	366	43	1849	5,07
neutrophile Myelocyten	222	196	209	13	169	0,81
eosinophile Myelocyten	53	89	71	18	324	4,56
Jugendliche	147	141	144	3	9	0,06
Stabkernige	35	25	30	5	25	0,84
neutrophile Segmentkernige	149	54	101,5	47,5	2256,25	22,22
eosinophile Segmentkernige	44	55	49,5	5,5	30,25	0,61

$\chi^2 = 34,31$

$P < 1‰$

Kulturzeit: 48 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	9	18	13,5	4,5	20,25	1,50
Promyelocyten	199	309	254	55	3025	11,91
neutrophile Myelocyten	175	232	203,5	28,5	812,25	3,99
eosinophile Myelocyten	38	55	46,5	8,5	72,25	1,55
Jugendliche	160	209	184,5	24,5	600,25	3,25
Stabkernige	76	47	61,5	14,5	210,25	3,42
neutrophile Segmentkernige	307	110	108,5	98,5	9702,25	46,54
eosinophile Segmentkernige	36	20	28	8	64	2,28

$\chi^2 = 74,44$

$P < 1‰$

Kulturzeit: 74 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	5	9	7	2	4	0,57
Promyelocyten	65	52	58,5	6,5	42,25	0,72
neutrophile Myelocyten	129	215	172	43	1849	10,63
eosinophile Myelocyten	37	55	46	9	81	1,76
Jugendliche	172	314	243	71	5041	20,80
Stabkernige	137	150	143,5	6,5	42,25	0,29
neutrophile Segmentkernige	433	177	305	128	16384	53,71
eosinophile Segmentkernige	22	28	25	3	9	0,36

$\chi^2 = 88,84$

$P < 1‰$

4. Versuchsreihe

Kulturzeit: 24 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	6	13	9,5	3,5	12,25	1,30
Promyelocyten	291	322	306,5	15,5	240,25	0,78
neutrophile Myelocyten	224	258	241	17	289	1,20
eosinophile Myelocyten	36	48	42	6	36	0,85
Jugendliche	172	163	167,5	4,5	20,25	0,12
Stabkernige	81	71	76	5	25	0,33
neutrophile Segmentkernige	167	95	131	36	1296	9,90
eosinophile Segmentkernige	23	30	26,5	3,5	12,25	0,50

$\chi^2 = 15,00$

$P > 1\%$

Kulturzeit: 72 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	0	4	2	2	4	2,00
Promyelocyten	2	33	17,5	15,5	240,25	13,72
neutrophile Myelocyten	311	408	359,5	48,5	2352,25	6,54
eosinophile Myelocyten	11	33	22	11	121	5,50
Jugendliche	250	247	248,5	1,5	2,25	0,00
Stabkernige	118	83	100,5	17,5	306,25	3,04
neutrophile Segmentkernige	290	178	234	56	3136	13,40
eosinophile Segmentkernige	18	14	16	2	4	0,25

$\chi^2 = 44,45$

$P < 1‰$

5. Versuchsreihe

Kulturzeit: 24 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	18	22	20	2	4	0,20
Promyelocyten	322	430	376	54	2916	7,76
neutrophile Myelocyten	192	157	174,5	17,5	306,25	1,76
eosinophile Myelocyten	82	112	97	15	225	2,32
Jugendliche	142	111	126,5	15,5	240,25	1,90
Stabkernige	75	42	58,5	16,5	272,25	4,65
neutrophile Segmentkernige	116	89	102,5	13,5	182,25	1,78
eosinophile Segmentkernige	53	37	45	8	64	1,73

$\chi^2 = 22,10$

$P < 1\%$

Kulturzeit: 48 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	27	26	26,5	0,5	0,25	0,00
Promyelocyten	191	199	195	4	16	0,08
neutrophile Myelocyten	366	421	393,5	27,5	756,25	1,92
eosinophile Myelocyten	128	121	124,5	3,5	12,25	0,09
Jugendliche	105	86	95,5	9,5	90,25	0,95
Stabkernige	55	37	46	9	81	1,76
neutrophile Segmentkernige	77	61	69	8	64	0,93
eosinophile Segmentkernige	51	49	50	1	1	0,02

$\chi^2 = 5,75$

$P > 1\%$

Kulturzeit: 72 Stunden

	a	b	m	Δ	Δ^2	$\frac{\Delta^2}{m}$
Myeloblasten	32	26	29	3	9	0,31
Promyelocyten	146	182	169	23	529	3,13
neutrophile Myelocyten	221	411	316	95	9025	28,56
eosinophile Myelocyten	83	120	101,5	18,5	342,25	3,37
Jugendliche	190	128	159	31	961	6,04
Stabkernige	71	43	57	14	196	3,44
neutrophile Segmentkernige	208	55	131,5	76,5	5852,25	44,50
eosinophile Segmentkernige	49	35	42	7	49	1,17

$\chi^2 = 90,52$

$P < 1‰$

Zusammenfassung der Reifungskurven

Reifungskurven unter 0,5 mg% Östrogen:

Die Ausreifung der weißen Vorstufen wird durch einen Östrogenzusatz von 0,5 mg% zum Nährmedium in erheblichem Maße gefördert. Die signifikanten Veränderungen bestehen vor allem in der Zunahme der neutrophilen Segmentkernigen und der Verminderung der Promyelocyten und neutrophilen Myelocyten. Diese Rechtsverschiebung in der weißen Reihe ist in vier Fällen schon um die 24. Kulturstunde signifikant. Mit zunehmender Bebrütungsdauer wird die Änderung der Zellverteilung durch Östrogen immer deutlicher.

Nur im ersten Fall findet sich um die 75. Stunde kein signifikanter Unterschied mehr zu der Kontrollkultur, da es zu einer Abnahme der neutrophilen Segmentkernigen und zur Vermehrung der neutrophilen Stabkernigen gegenüber den 48-Stunden-Werten gekommen ist.

Im fünften Fall findet sich eine weitgehend gleiche Zellzusammensetzung in der Kontroll- und Östrogenkultur in der 48. Stunde, während in der 72. Stunde die Rechtsverschiebung durch Östrogen gegenüber dem Kontrollversuch wieder signifikant ist.

Die eosinophilen Myelocyten verhalten sich hinsichtlich einer Veränderung gegenüber den Kontrollwerten in der Regel wie die neutrophilen Myelocyten. Dagegen wird die Zahl der eosinophilen Segmentkernigen, unabhängig vom jeweiligen Anteil der neutrophilen Segmentkernigen, in Kontroll- und Östrogenkulturen stets gleich hoch gefunden.

Reifungskurven unter 5 mg% Östrogen:

Der Östrogenzusatz von 5 mg% bewirkt im ersten Fall nach 26 und 48 Stunden, im zweiten Fall nur nach 24 Stunden eine geringe Rechtsverschiebung innerhalb der weißen Reihe mit Vermehrung der neutrophilen Segmentkernigen. Im ersten Fall kommt es nach 75 Stunden zu einem zweiten Promyelocytenanstieg.

Reifungskurven unter 50 mg% Östrogen:

In der Konzentration von 50 mg% führt Östrogen zu einer erheblichen Zellschädigung und Hemmung der Zellausreifung.

c) Der Mitoseindex der weißen Reihe ist in allen fünf Versuchsfällen um die 24. Stunde, im fünften Fall deutlicher um die 48. Stunde, unter der Einwirkung von0,5 mg% Östrogen gegenüber den Kontrollwerten erhöht. (Tabelle)

Bei den niedrigen Mitoseindices um die 48. und 72. Stunde ist die Erhöhung in den Östrogenkulturen gegenüber den Kontrollkulturen nicht erheblich.

Da die Kontrollkultur der ersten Versuchsreihe nach 75 Stunden sehr viel Detritus aufweist und sich unter 600 auszählbaren teilungsfähigen Zellen nur eine Mitose findet, ist der Mitoseindex von 2 ‰ ein fiktiver Wert.

Die Summe aller gezählten Mitosen beträgt in den Kontrollkulturen 101, unter 0,5 mg% Östrogen 163 Kernteilungsfiguren. Es wurde eine karyologische Kurve aufgestellt, um die völlige Übereinstimmung der Mitosephasenverteilung in Kontroll- und Östrogenkulturen aufzuzeigen (Abb. 9). Es ist deutlich zu erkennen, daß es durch Östrogen nicht zu einer Arretierung der Mitosen in einer bestimmten Phase gekommen ist.

Die Zählung der Prophasen wurde mit großer Vorsicht und Zurückhaltung vorgenommen, da in den Kulturen gelegentlich Zellkerne mit degenerativ veränderter Struktur gefunden wurden, die eine Unterscheidung von der echten Chromosomenauflockerung der Prophase erschwerten. So erklärt sich der geringe Prophasenanteil von 3 bzw. 4 % in den Kulturen gegenüber 12 % in den Originalausstrichen, die eine Abgrenzung der Prophase vom Ruhekern mit größerer Genauigkeit zulassen.

In den beiden Kulturversuchen mit dem Östrogenzusatz von 5 mg% ergibt die Auszählung der Mitosen keine Unterschiede in Anzahl und prozentualer Phasenverteilung zu den Kontrollkulturen.

Tabelle

Mitoseindices der weißen Reihe in Kontrollversuchen und bei Zusatz von 0,5 mg% Östrogen in ‰.

K = Kontrollversuche

Ö = Kulturen mit 0,5 mg% Östrogen

XX = es wurden keine Ausstriche angefertigt

Versuchs-reihe	1		2		3		4		5		errechneter Durchschnitt	
Original-ausstrich	9		9		11		15		7		10	
Zeit in Stunden	K	Ö	K	Ö	K	Ö	K	Ö	K	Ö	K	Ö
24/26	6	13	12	18	12	18	6	12	4	6	8	13
48	6	5	6	5	8	9	X	X	2	9	5,5	7
72/75	2	5	5	6	2	4	0	0	0	0	2	3

Granuloblasten-Mitosen.

Prozentuale Verteilung der Mitosephasen auf

101 Mitosen in den Kontrollkulturen und

163 Mitosen in den Kulturen mit 0,5mg% Östrogen

P = Prophase
FM = frühe Metaphase
SM = späte Metaphase
A = Anaphase
T = Telophase
R = Rekonstruktionsphase

——— Kontrollkultur

——— Kultur mit 0,5 mg% Östrogen

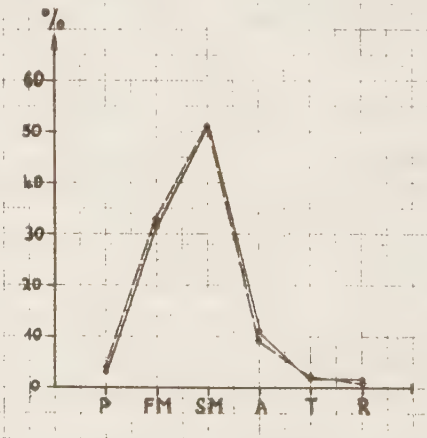

Abbildung 9

Bei der Östrogen-Konzentration von 50 mg % im Nährmedium liegt der Mitoseindex von 4 ‰ um die 26. Kulturstunde unter dem Kontrollindex von 6 ‰, und um die 48. und 75. Stunde wurden keine Kernteilungsfiguren mehr gefunden.

d) Die Differentialzählung der Erythroblasten ergibt nur im ersten Fall bei dem Östrogenzusatz von 0,5 mg% nach 26, 48 und 75 Stunden Kulturzeit eine deutliche Vermehrung der reifen Zellen gegenüber den Kontrollwerten, kann aber bei zu kleiner Gesamtzellzahl nicht sicher verwertet werden. In allen übrigen Kulturen mit den verschiedenen Östrogenzusätzen bestehen keine Unterschiede in der Zellzusammensetzung der roten Reihe gegenüber den Kontrollversuchen.

Der absolute Anteil an Erythroblasten auf 1000 weiße Zellen liegt bei den Östrogenkonzentrationen von 0,5 mg% und 5 mg% durchschnittlich niedriger als in den Kontrollkulturen.

In der einen 50 mg%-Kultur ist er nach 48 und 75 Kulturstunden gegenüber dem Kontrollwert um das Doppelte erhöht, bei gleichem prozentualen Anteil der einzelnen Erythroblastenformen.

Die Zählung der Kernteilungsfiguren ergab keine sicheren Unterschiede im Mitoseindex der roten Reihe in den Kontroll- und Östrogenkulturen.

e) Die Auszählung der Reticulumzellen in den Kontroll- und Östrogenkulturen bis zu 75 Stunden läßt keine Gesetzmäßigkeit ihrer Entwicklung erkennen. Auch kann keine charakteristische Beziehung ihres Verhaltens zwischen den Kontrollversuchen und den Kulturen mit verschiedenen Östrogenzusätzen festgestellt werden.

C Diskussion

Zur Beantwortung der Frage, ob Östrogen eine direkte stimulierende Wirkung auf die Knochenmarkzellen in vitro besitzt, wird nur die Granulopoese unter 0,5 mg% herangezogen, weil die höhere Konzentration von 5 mg% einen wesentlich geringeren Effekt auf Mitosehäufigkeit und Reifung zeigte und 50 mg% bereits toxisch wirkten.

Bei der Differentialzählung kann nur die relative Zellzusammensetzung innerhalb der weißen Reihe erfaßt werden, jedoch nicht die absolute Zellzahl der Kultur.

Es stellen sich daher folgende Fragen:
Beruht die Zunahme der segmentkernigen Granulocyten auf einer Stabilisierung durch Östrogen?
Ist ihre Vermehrung auf eine beschleunigte Ausreifung zurückzuführen?
Wird die Proliferationsaktivität, also die Teilungs- und Reifungstätigkeit, des Knochenmarks angeregt?

Bei einer isolierten Stabilisierung der segmentkernigen Granulocyten müßte der prozentuale Anteil aller übrigen Zellformen in gleichem Maße herabgesetzt sein. Bei Verminderung ihres absoluten Anteiles müßte also das Verhältnis der einzelnen Vorstufen zueinander durchaus ihrer Verteilung in der Kontrollkultur entsprechen.

Unter der Behandlung mit Östrogen findet sich aber, wechselnd mit der Dauer der Kulturzeit, eine Reduktion besonders ausgeprägt bei den Promyelocyten, Myelocyten und in geringerem Maße bei den Jugendlichen. Östrogen bewirkt also nicht allein eine Zunahme der Segmentkernigen, sondern ebenso zeitabhängig eine Verminderung bestimmter unreifer Zellformen, vornehmlich der Promyelocyten und Myelocyten. Weist schon diese Tatsache auf einen aktiven Einfluß des Östrogens auf die Ausreifungsvorgänge hin, so muß eine Stabilisierung der Segmentkernigen noch aus einem anderen Grund verneint werden. An der Zunahme der reifen Zellen sind allein die neutrophilen Segmentkernigen beteiligt, während die Zahl der eosinophilen Segmentkernigen

den Kontrollwert nicht überschreitet. Eine Stabilisierung der segmentkernigen Granulocyten müßte aber beide Zellformen in gleicher Weise erfassen.

Durch Östrogen wird also nur in der neutrophilen Granulopoese eine Änderung herbeigeführt. Da es sich bei der prozentualen Zellverschiebung aus den dargelegten Gründen nicht um eine Stabilisierung der Segmentkernigen handeln kann, ist die einzige Erklärungsmöglichkeit hierfür die beschleunigte Ausreifung der weißen Vorstufen, wie schon von ARNOLD, HAMPERL, HOLTZ, JUNKMANN und MARX [1] auf Grund ihrer tierexperimentellen Befunde angenommen wurde.

BOLL und FUCHS [24] haben dargelegt, daß in der Koagulumkultur durch die Ausreifung und Teilung der Zellen ihr prozentualer Anteil im Laufe der Kulturzeit in gesetzmäßiger Weise wechselt. Sie konnten für die zeitabhängigen Änderungen der Zellzusammensetzung in der Knochenmarkkultur eine mathematisch befriedigende Vorhersage treffen, indem sie ihren Berechnungen die von WEICKER am Lebenden gewonnenen Werte für die Mitosehäufigkeit, die Verweildauer in den einzelnen Reifestadien und die durchschnittliche Lebensdauer der Knochenmarkzellen zugrundelegten.

Die Zellverschiebung in der Koagulumkultur ist also kein Artefact, sondern sie muß auf die Proliferationseigentümlichkeit der vom Mutterboden getrennten Knochenmarkzellen zurückgeführt werden.

In Übereinstimmung hiermit läßt sich auch in den fünf Kontrollkulturen der vorliegenden Versuchsreihen eine Gesetzmäßigkeit in der Zellentwicklung verfolgen.

Um die 24. Stunde findet sich regelmäßig ein deutlicher Promyelocytenanstieg, der in 3 Fällen von einer Vermehrung der Myelocyten begleitet ist. Um die 48. Stunde hat sich der prozentuale Anteil an reiferen Zellen - Jugendlichen, Stab- und Segmentkernigen - vergrößert und steigt bis zur 72. bzw. 75. Stunde weiter an.

Im fünften Fall weichen die Reifungskurven nur scheinbar von diesem typischen Verlauf ab. Durch den hohen Anteil an Myeloblasten im Sternalpunktat kommt es nach 24 Stunden zu einem außergewöhnlich starken Promyelocytenanstieg und nach 48 Stunden zu einer erheblichen Vermehrung der Myelocyten, da die Myeloblasten innerhalb von 2 Tagen zu Myelocyten ausgereift sind. Durch gleichzeitige Vermehrung dieser unreifen Zellformen vermindert sich der prozentuale Anteil an reiferen Zellen, an Jugendlichen, Stab- und Segmentkernigen.

Nach ROHR [27] braucht die Ausreifung der Myeloblasten zu Jugendlichen länger als 3 Tage. In Übereinstimmung hiermit findet sich um die 72. Stunde noch keine wesentliche Vermehrung der Metamyelocyten und der übrigen reifen Zellen gegenüber den 48-Stunden-Werten.

Die bei den Kontrollkulturen gefundene Gesetzmäßigkeit in der Zellenentwicklung erfährt durch Östrogenzusatz keine Änderung. Unter dem Einfluß des Östrogens kommt es lediglich zu einer Rechtsverschiebung innerhalb der weißen Reihe auf Grund der beschleunigten Ausreifung. Im fünften Fall zeigt sich deutlich, daß schon die Reifungszeit der Myeloblasten verkürzt wird, denn um die 72. Stunde findet sich im Gegensatz zur Kontrollkultur bereits eine deutliche Zunahme der Jugendlichen sowie auch der neutrophilen Segmentkernigen.

Ein von der Kontrollkultur abweichender Verlauf der Reifungskurven ergibt sich nur im ersten Fall bei allen drei Östrogenkonzentrationen.

Unter 50 mg% kommt es zu einem weitgehenden Verlust an reiferen Zellen, der auf einer direkten Zellschädigung oder auf einer Reifungshemmung beruhen kann. Da lytische Zellen und pyknotische Kerne nicht deutlich vermehrt sind, ist eher eine Reifungshemmung durch die hohe Dosis anzunehmen.

Bei dem Östrogenzusatz von 5 mg% findet sich um die 75. Stunde eine starke Vermehrung der Promyelocyten. Sie muß auf eine erneute Anregung der

Granulopoese durch diese Östrogenkonzentration zurückgeführt werden, da sie vorwiegend zu Lasten der Myelocyten und Jugendlichen geht, was gegen die Möglichkeit spricht, daß die Zunahme der Promyelocyten auf einer Reifungshemmung beruht.

Im Analogieschluß wird angenommen, daß auch in der Kultur mit 0,5 mg% Östrogen eine erneute Anregung der Granulopoese erfolgt ist. Es findet sich zwar um die 75. Stunde eine von der 5 mg%-Kultur abweichende Zellzusammensetzung - Zunahme der Stabkernigen und Verminderung der neutrophilen Segmentkernigen -, da Östrogen aber in der Konzentration von 0,5 mg% die Zellentwicklung wesentlich stärker stimuliert als in der zehnfachen Dosis von 5 mg%, ist es denkbar, daß der zweite Promyelocytenanstieg bereits in dem Intervall zwischen der 48. und 75. Stunde erfolgte, in welchem keine Ausstrichpräparate angefertigt wurden. Der promyelocytäre Schub wird in der 75. Stunde nicht mehr erfaßt, weil bereits eine weitgehende Ausreifung stattgefunden hat, die ihren Niederschlag in der Zunahme der Stabkernigen findet. Die Vermehrung der unreifen Zellen wirkt sich jedoch zu diesem Zeitpunkt noch in einer Verminderung des prozentualen Anteils an neutrophilen Segmentkernigen aus.

In der Knochenmarkkultur muß für die Annahme einer gesteigerten Proliferation neben der beschleunigten Ausreifung eine Vermehrung der Mitosen gefordert werden.

Bei der Konzentration von 0,5 mg% Östrogen im Nährmedium ist der Mitoseindex der weißen Reihe um die 24. Stunde, in einem Fall deutlicher um die 48. Stunde, regelmäßig erhöht. Die völlige Übereinstimmung der prozentualen Mitosephasenverteilung in Östrogen- und Kontrollkulturen (Abb. 9) schließt die Vermehrung der Kernteilungsfiguren durch Verzögerung im Teilungsvorgang oder durch Arretierung in einer bestimmten Phase, also eine Mitoseschädigung, aus. Es muß daher eine echte Anregung der Mitoseaktivität angenommen werden.

Auch BOLL [23] beobachtete in Knochenmarkkulturen eine gleichmäßige Vermehrung aller Mitosephasen in der weißen Reihe durch Östradiol.

GIROD [28] fand einen erhöhten mitotischen Index der Granuloblasten im Sternalpunktat von Affen, denen er Östradiol verabreicht hatte.

Nach BULLOUGH [29] wirken die Östrogene über das Glucogenase-System stimulierend auf die Mitoseaktivität.

Der vorliegende Befund einer echten Proliferationsanregung der Granulopoese in vitro durch Östrogen entspricht den Versuchsergebnissen zahlreicher Autoren (1 ... 5; 7 ... 10; 30), die die Wirkung des Follikelhormons auf die Blutbildung von Mensch und Tier prüften.

Pathologische Mitoseformen, insbesondere Chromosomenabsprengungen, wie sie v. MÖLLENDORFF [12,13] in Fibroblastenkulturen bei den Östrogenzusätzen von 0,5 mg% bis 10 mg% vermehrt beobachtete, finden sich in den vorliegenden Kulturen aller drei Östrogenkonzentrationen nicht häufiger als in den Kontrollversuchen. Auch SCHLAG und BOLL [22] sahen kein vermehrtes Auftreten von Chromosomenabsprengungen in Knochenmarkkulturen durch Östradiol.

LETTRÉ [19] beobachtete in Fibroblastenkulturen mit Östradiolzusatz eine Vermehrung der Mitosen, die er auf eine Hemmung im Teilungsvorgang zurückführte. Die kleinste wirksame Dosis von 4 mg% betrug das Achtfache der Konzentration, die in unseren Versuchen als optimal für eine Stimulierung der Granulopoese ermittelt wurde. In den vorliegenden Versuchskulturen ist der Mitoseindex bei der Östrogenkonzentration von 5 mg%, die ungefähr der 'mitosehemmenden' Dosis von LETTRE entspricht, gegenüber dem Kontrollwert nicht erhöht. In der 50 mg%-Kultur liegt er sogar unter dem Kontrollindex. Eine Vermehrung der Mitosen findet sich in den Knochenmarkkulturen nur bei der Östrogenkonzentration von 0,5 mg%, die auch hinsichtlich der Beschleunigung der Ausreifung den stärksten Effekt zeigt. Sie ist hier auf Grund der karyologischen Kurven (Abb. 9) und dem Fehlen pathologisch veränderter Mitosephasen nicht auf eine Hemmung im Teilungsvorgang zurückzu-

führen, sondern sie beruht auf einer echten Stimulierung der Mitoseaktivität und ist zusammen mit der Reifungsförderung Ausdruck der gesteigerten Proliferationstätigkeit der Granulopoese in vitro durch 0,5 mg% Östrogen.

Der absolute Anteil an Erythroblasten auf 1000 weiße Zellen ist in den Kulturen mit 0,5 mg% und 5 mg% Östrogen gegenüber den Kontrollversuchen in der Regel erniedrigt.

Diese Reduktion kann beruhen auf einer beschleunigten Ausreifung der roten Zellen, auf einer Hemmung der Erythropoese oder auf einer Verschiebung im Verhältnis der roten zur weißen Reihe zugunsten der weißen Reihe durch eine gesteigerte Granulopoese.

Eine Vermehrung der reifen Erythroblasten gegenüber den Kontrollwerten wird nur in einem Fall bei dem Östrogenzusatz von 0,5 mg% gefunden. In den übrigen Östrogenkulturen entspricht die prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Reifungsstadien den Kontrollversuchen. Es läßt sich aus den Versuchen weder eine Hemmung noch eine Stimulierung der Erythropoese durch Östrogen sichern.

In der 50 mg%-Kultur, in welcher eine Reifungshemmung der weißen Reihe vorliegt, ist die absolute Zahl der Erythroblasten auf 1000 weiße Zellen um die 48. und 75. Kulturstunde doppelt so hoch wie im Kontrollversuch, bei gleicher prozentualer Verteilung der einzelnen Zellformen. Dieser Befund könnte dafür sprechen, daß die Verminderung des Erythroblastenanteils in den beiden schwächeren Östrogenkonzentrationen auf der gesteigerten Granulopoese beruht. Es könnte auch eine größere Stabilität der Erythroblasten gegenüber der Einwirkung von Östrogen vorliegen.

Es können hier aber nur Aussagen über die direkte Beeinflussung der Granulopoese durch Östrogen gemacht werden, da die Beurteilung der Erythropoese in vitro durch die schnelle Ausreifung der roten Vorstufen und der damit verbundenen starken Reduktion ihres Anteils im Laufe der Kulturzeit sehr erschwert wird.

Es sei dahingestellt, daß Östrogen in denselben Konzentrationen, wie sie in den vorliegenden Versuchen verwendet wurden, auf andere Gewebe wie Fibroblasten oder Embryonalgewebe eine toxische, mitosehemmende Wirkung ausüben kann.

Aus den vorliegenden Befunden einer Proliferationsanregung der Granulopoese in vitro durch Östrogen in Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen zahlreicher anderer Autoren (1 ... 5; 7 ... 10) ergibt sich die Frage nach der therapeutischen Anwendbarkeit östrogener Stoffe bei leukopenischen Blutbildveränderungen.

CRAMER und BRODERSEN [30] erzielten bei Leukopenien verschiedener Genesen regelmäßig einen Anstieg der Granulocytenwerte durch Verabreichung von Progynon in der Einzeldosis von 5 mg.

Auch OESER [8] hatte gute Erfolge mit Follikelhormon bei leukopenischen Zuständen nach Röntgenbestrahlung.

Da es bisher nicht gelungen ist, wirksame Präparate zur Heilung von Leukopenien herzustellen, sollte noch einmal überprüft werden, inwieweit durch die Applikation östrogener Stoffe eine Anregung der Granulopoese in vivo und somit eine Besserung des granulocytopenischen Krankheitsbildes erreicht werden kann.

D Zusammenfassung

Es wurde die Wirkung von Östrogen auf Knochenmarkzellen in vitro untersucht.

Von der Granulopoese wurden Reifungskurven aufgestellt, Mitoseindices gezählt und die prozentuale Mitosephasenverteilung in karyologischen Kurven graphisch dargestellt.

Es ergibt sich, daß Östrogen in der Konzentration von 0,5 mg% im Nährmedium eine Proliferationsanregung der Granulopoese mit signifikanter Beschleunigung der Ausreifung und Erhöhung des Mitoseindex bewirkt.

Bei 5 mg% findet sich nur in geringem Maße eine Rechtsverschiebung der weißen Reihe.

50 mg% Östrogen führen zu einer Schädigung des morphologischen Zellbildes insbesondere der Granulopoese mit Reifungshemmung der weißen Zellen.

In der Erythropoese ist unter acht Versuchen nur in einem Fall bei 0,5 mg% Östrogen eine beschleunigte Ausreifung zu erkennen. Es wurde keine Wirkung des Östrogens auf den roten Mitoseindex festgestellt.

E Literaturverzeichnis

1) Arnold, O., Hamperl, H., Holtz, F., Junkmann, K. und Marx, H.:

Über die Wirkung des Follikelhormons auf Knochenmark und Blut bei Hunden.

Arch. exp. Path. Pharmakol. 186, 1, 1 (1937)

2) v. Baló, J. und Purjesz, B.:

Über die Wirkung des Follikelhormons.

Klin. Wschr. 16, 1150 (1937 II)

3) Bareuther, A. und Schabbel, E.:

Beziehungen zwischen Follikelhormon und Thrombocyten im Tierversuch.

Klin. Wschr. 16, 1677 (1937 II)

4) Arnold, O.:

Über die Wirkung des synthetischen Brunststoffes Diäthylstilböstrol auf das Knochenmark und Blut des Hundes.

Klin. Wschr. 18, 891 (1939 I)

5) Dubrauszky, V. und Martzy:

Bericht: Die Wirkung östrogener Stoffe auf die blutbildenden Organe.

Zbl. Gynäk. 16, 694 (1942)

6) Dukes, P.P. und Goldwasser, E.:

Hemmung der Erythropoese durch Oestrogene.

Endocrinology 69, 21 (1961)
Ref.: Kgr. Zbl. 237, 1:59 (1962)

7) Feuchtinger, O.:

Follikelhormon und Blutbild.

Arch. exp. Path. Pharmakol. 196, 644 (1940)

8) Feuchtinger, O.:

Der Einfluß des Follikelhormons auf normale und pathologische Blutbildungsvorgänge.

Z. Klin. Med. 141, 6, 697 (1942)

9) Bokelmann, O.:

Bericht: Beitrag zur Frage der Bedeutung des Blutbildes im mensuellen Zyklus des Weibes.

Zbl. Gynäk. 43, 2521 (1937)

10) Diesterbeck, R.:

Beeinflussung des Blutbildes durch Follikelhormon.

Arch. Gynäk. 175, 1, 123 (1944)

11) Gerhartz, H.:

Habilitationsarbeit 1958, S. 71

12) v. Möllendorff, W.:

Durch carcinogene Kohlenwasserstoffe und Geschlechtshormone in Gewebekulturen erzielte Mitosestörungen.

Klin. Wschr. 18, 1098 (1939 II)

13) v. Möllendorff, W.:

Zur Analyse des pathologischen Wachstums, hervorgerufen durch Chloralhydrat, Geschlechtshormone und cancerogene Kohlenwasserstoffe.

Z. Zellforsch. 29, 706 (1939)

14) Druckrey, H., Danneberg, P. und Schmähl, D.:

Mitosegiftwirkung von Östrogenen.

Naturwissenschaften 39, 381 (1952)

15) Druckrey, H.:

Experimentelle Grundlagen der Chemotherapie des Krebses.

Dtsch. med. Wschr. 77, 1495 (1952)
77, 1534 (1952)

16) Druckrey, H. und Raabe, S.:

Organspezifische Chemotherapie des Krebses (Prostata-Carcinom)

Klin. Wschr. 30, 882 (1952)

17) Hohlweg, W. und Groot-Wassink, K.A.:

Wie wirkt das Stilboestrolphosphat beim Prostatacarcinom?

Dtsch. GesundhWes. 4, 14.Jg., 152 (1959)

18) Agrell, I., cit. n. Bullough, W.S.:

Nature 173, 172 (1954)

19) Lettré, H.:

Hemmung der Zellteilung durch östrogene Faktoren.

Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 278, 201 (1943)

20) Lettré, H.:

Mitosegifte und cancerogene Faktoren als Antibiotica.

Z. Krebsforsch. 56, 5 (1948)

21) Robert J. Kuchler, Nancy J. Arnold and Robert C. Grauer:

Estradiol - Cellular Interaction in Tissue Culture.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,
1962, v 111, 798 - 804

22) Schlag, H. und Boll, I.:

Über die Einwirkung von Östradiol auf Knochenmarkzellen in vitro.

Ärztl. Wschr. 6, 47 (1951)

23) Boll, I.:

Wissenschaftliche Ausstellung
7. int. haemat. Congr. Rom 1958

24) Boll, I. und Fuchs, G.:

Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro.

Blut - Band VII, 257 - 272 (1961)

25) Boll, I.:

Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro.
- Granuloblastenmitosen.

Fol. haemat., N.F. 3, 1, 58 (1958)

26) Wissenschaftliche Tabellen
J. R. Geigy Basel, 1955

27) Rohr, K.:

Das menschliche Knochenmark.

(Thieme, Stuttgart 1960)

28) Girod, C.:

A propos du mécanisme d'action des oestrogènes sur la moelle osseuse hématogène.

Comptes rendus des séances de la Société Biologie;
tome 153, 780 (1959)

29) Bullough, W.S.:

Hormones and Mitotic Activity.

Vit. & Horm. 13 : 261 (1955)

30) Cramer, H. und Brodersen, H.:

Follikelhormon bei Leukopenie.

Münch. med. Wschr. 88, 619 (1941 I)

Am Ende dieser Arbeit möchte ich allen jenen danken, die mir bei der Fertigstellung behilflich waren.

Frau Oberarzt Dr. med. I. Boll hat mir die Anregung zu dem gewählten Thema gegeben und meine Arbeit mit ihrem fachkundigen Rat begleitet.

Herr Privatdozent Oberarzt Dr. med. Dr. rer. nat. G. Fuchs gab mir die Anleitungen zur Durchführung der Signifikanzberechnung.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank dem ärztlichen Direktor des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln, Herrn Professor Dr. med. K. Holldack, für die freundliche Hilfe und Unterstützung, die mir in seinem Hause zuteil wurden.

Lebenslauf

Am 17. Mai 1939 wurde ich als Tochter des Bankkaufmanns Ernst Hamann und seiner Ehefrau Maria-Elisabeth, geb. Hoepffner, in Berlin geboren.

Am 1. Oktober 1945 wurde ich in Berlin eingeschult und bestand am 11. März 1958 die Reifeprüfung.

Im Sommersemester 1958 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin. Am 10. April 1959 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung. Im Wintersemester 1959/60 und im Sommersemester 1960 studierte ich an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, wo ich am 18. Oktober 1960 die ärztliche Vorprüfung ablegte.

Die klinischen Semester studierte ich an der Freien Universität Berlin, mit Ausnahme des Wintersemesters 1961/62, in welchem ich an der Universität zu Wien immatrikuliert war.

Am 2. November 1964 bestand ich in Berlin die ärztliche Prüfung.